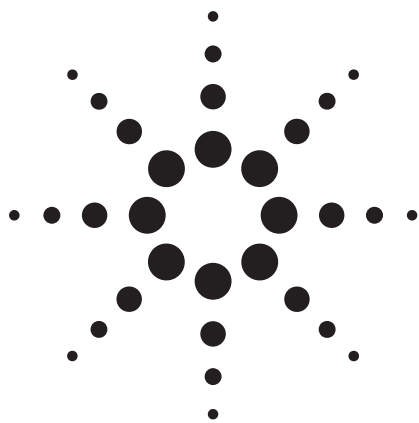




LC/MS/MS による尿中のブプレノルフィン、 ノルブプレノルフィンと これらのグルクロニドの定量

アプリケーション

法医学

著者

Christine Moore, Cynthia Coulter, and Katherine Crompton
Immunalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

For purposes of contact only:

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

要約

エレクトロスプレーモードの Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計を用いた、尿中のブプレノルフィン、その代謝物であるノルブプレノルフィン、およびこれらのグルクロニドを同時に分析するための、迅速で簡単な高感度分析法について紹介します。LC/MS/MS システムに直接注入するため、サンプル前処理として脱イオン水で尿サンプルを希釈しました。グルクロニドが遊離型薬物として同じアッセイでモニタリングされるため、加水分解や抽出は必要ありませんでした。我々の知る限り、この分析に、親薬物のクオリファイアイオンの同時モニタリングを含める方法は初めてです。そのため、クオリファイアイオンは定量イオンに対して許容範囲内 ($\pm 20\%$) で存在することが必要となります。Agilent MassHunter ソフトウェアは、イオンのトランジションをモニタリングし、その割合を自動的に計算することが可能ですが、そのためには、トランジションの割合が、ポジティブと考えられるキャリブレーション用標準品の範囲内に入る必要があります。クオリファイアイオンをモニタリングすると、分析の感度は低くなりますが、その結果の信頼性は法医学分析で重要な要素です。

緒言

ブプレノルフィン、慢性疼痛の治療薬、そしてヘロイン中毒におけるメタドンの代替品で、オピオイド族の一員です。これはノルブプレノルフィンに代謝され、両方の種は尿排泄前にグルクロニドとなります。ブプレノルフィン、ノルブプレノルフィン、メタドンの同時測定は最近発表されました [1]。尿中のブプレノルフィン検出用の液体クロマトグラフメソッドは、加水分解、遠心分離、および/または抽出を行う遊離型薬物に大部分が向けられてきました [2 ~ 4]。しかし、2003 年に、Kronstrand らが、LC/MS/MS を用いた尿中の遊離型と抱合型両方の化合物の検出に関して初めて報告し、20 ng/mL の低濃度遊離型化合物が患者の検査に適していることに言及しました。彼らは、検体を加水分解し、それらの固相抽出を行うことで、検出下限を向上させた [5]。

ここでは、脱イオン水で希釈した分析用尿中のブプレノルフィン、ノルブプレノルフィン、それらのグルクロニドを、1 ng/mL の感度で検出する迅速分析法について報告します。遊離型薬物に対して 2 つのトランジションがモニタリングされ、グルクロニドに関して 1 つのトランジションがモニタリングされます。クオリファイアイオンのモニタリングと主要なトランジションの強度に対するその割合の計算は、ソフトウェアパッケージにとって不可欠な部分で、法医学同定に必要です。

本法は、すべての測定対象物を 8 分以内に測定し、サンプルで、感度が高く、迅速な分析方法です。



Agilent Technologies

実験

材料とメソッド

標準試料と試薬

D4-ブプレノルフィン (D4-BUP)、D3-ノルブプレノルフィン (D3-NBUP)、BUP、NBUP、BUP グルクロニド、NBUP グルクロニドは、Cerillant 社 (テキサス州ラウンドロック) から購入しました。すべての溶媒は HPLC グレード以上で、すべての試薬は ACS グレードで、Spectrum Chemical 社 (カリフォルニア州ガーディナ) から購入しました。

内部標準混合物 : D4-BUP、D3-NBUP (1,000 ng/mL)

非標識薬物 : BUP、NBUP、BUP グルクロニド、NBUP グルクロニド

抽出手順 - 尿

尿 (0.1 mL) に、脱イオン水 (0.35 mL) と内部標準 (1 µg/mL) 0.1 mL を加えます

検量線:

- a) ブランク: 0.1 mL D4-BUP、D3-NBUP
- b) 1 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 10 µL (100 ng/mL)
- c) 5 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 5 µL (1,000 ng/mL)
- d) 10 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 10 µL (1,000 ng/mL)
- e) 20 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 20 µL (1,000 ng/mL)
- f) 40 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 40 µL (1,000 ng/mL)
- g) 100 ng/mL: 0.1 mL D4-BUP と D3-NBUP BUP、NBUP、それらのグルクロニド 100 µL (1,000 ng/mL)

分析手順

機器: Agilent 1200 シリーズ RRLC、6410 トリプル四重極質量分析計

LC 条件:

カラム: ZORBAX Eclipse XDB C18
4.6 mm x 50 mm x 1.8 µm
(P/N: 822795-902)
寸法: 4.6 mm x 50 mm x 1.8 µm
カラム温度: 40 °C
注入量: 5 µL
溶媒流量: 0.8 mL/min

ポンププログラム:

時間 (分)	% 20 mM アンモニウム ギ酸塩 (A)	% メタノール (B)
0	40	60
2.5	40	60
5	0	100
8.5	0	100
10	40	60

ポストタイム: 3 分

質量分析計条件:

操作: エレクトロスプレー (ESI) ポジティブモード
ガス温度: 300 °C
ガス流量 (N₂): 6 L/min
ネブライザ圧力: 50 psi
キャピラリー電圧: 4500 V
デュエルタイム: 50 ms

MRM トランジションの設定値は表 1 のとおりです。
NBUP と BUP は定量と定性両方のプロダクトイオンを有します。

表 1. ブプレノルフィン取り込みパラメータ

化合物	プリカーサ イオン	フラグメント イオン	リテンション タイム(分)	フラグメント 電圧 (V)	CE (V)
グループ 1					
D3-NBUP	417.4	399.3	1.16	240	40
NBUP 3 グルクロニド	590.5	414.4	0.73	240	40
NBUP	414.4	340.4	1.17	240	35
		(187.2)	1.17	240	40
グループ 2					
D4-BUP	472.5	400.4	6.62	240	45
BUP 3 グルクロニド	644.5	468.4	5.21	240	40
BUP	468.4	414.4	6.68	240	35
		(396.1)	6.68	240	55

() クオリファイア比は検量線の 20% 以内である必要があります

LC/MS/MS メソッドバリデーション

分析メソッドは、標準プロトコールに従ってバリデーションされました。すなわち、定量下限、直線性範囲、相関、日中と日間精度などは、4 日間にわたり複数の同一試料によって測定されました。検量線は原点を通っていません。検量線や相関係数 (R^2) の式は表 2 のとおりで、分析の精度と再現性は表 3 のとおりです。10 ng/mL の

分析結果では、堅牢、精密、正確で、5 ~ 100 ng/mL の範囲にわたり直線性が見られました。すべての薬物に対する精度が、日中と日間の両方で 20% 以下で、ほとんどが 10% 以下の変動しか示しませんでした。定量下限は 5 ng/mL で、検出下限は 1 ng/mL でした。

図 1 には、0.9984 の相関係数を持つ、ブプレノルフィンの一般的な検量線を示します。

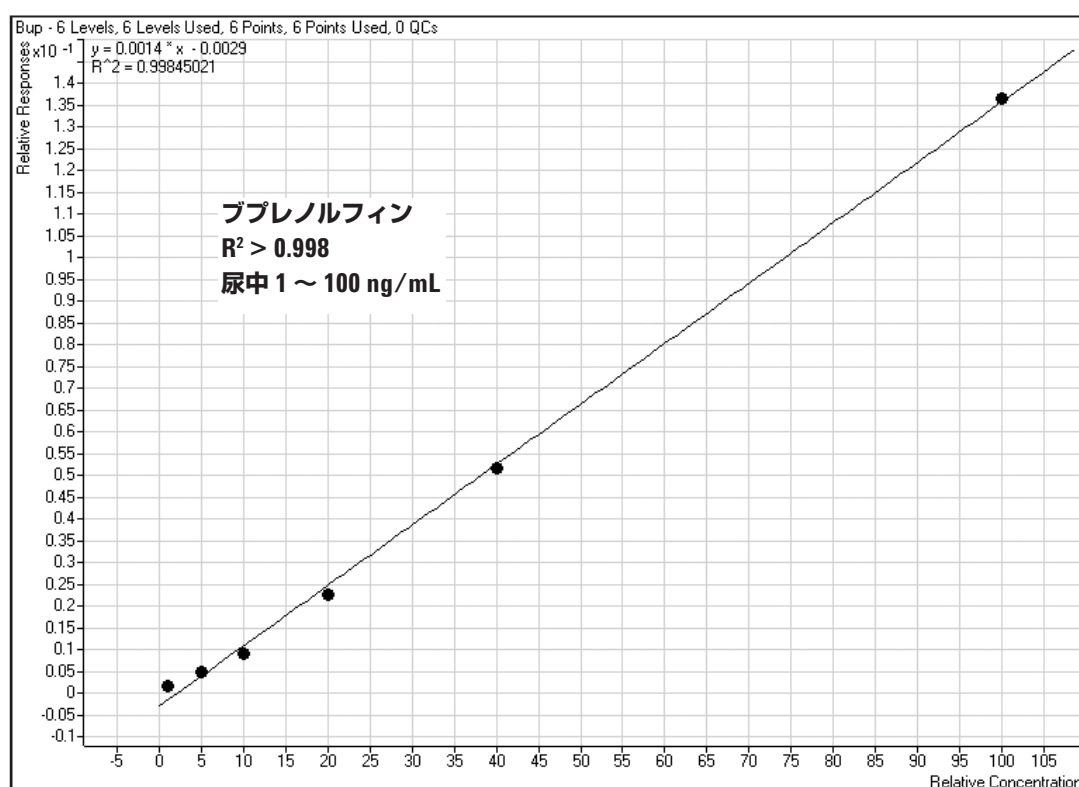


図 1. 尿中の遊離ブプレノルフィンの検量線

表 2. 尿中のブプレノルフィンと関連化合物の直線性、相関係数、許容クオリファイア比

薬物	キャリブレーション方程式	相関係数 (R ²)	許容クオリファイア比 (20%)
ブプレノルフィン	$Y = 0.0065x - 0.005$	0.9984	35.4 (28.3–42.5)
ノルブプレノルフィン	$Y = 0.0068x - 0.0036$	0.9995	44.9 (35.9–53.9)
ブプレノルフィン 3 グルクロニド	$Y = 0.0226x - 0.0064$	0.9927	
ノルブプレノルフィン 3 グルクロニド	$Y = 0.0013x - 0.0039$	0.9948	

表 3. 日間精度 (10 ng/mL コントロール検体、n = 10)

薬物	平均回収率 (ng/mL)	SD	精度 (%)
ブプレノルフィン	10.74	1.38	12.85
ノルブプレノルフィン	10.08	1.36	13.51
ブプレノルフィン グルクロニド	12.68	2.41	19.02
ノルブプレノルフィン グルクロニド	11.1	1.84	16.55

日中精度 (n = 5)

薬物	平均回収率 (ng/mL)	SD	精度 (%)
ブプレノルフィン	10.22	0.58	5.64
ノルブプレノルフィン	8.76	0.57	6.54
ブプレノルフィン グルクロニド	10	0.8	7.04
ノルブプレノルフィン グルクロニド	8.98	0.61	6.75

考察

本分析法によって、低濃度のブプレノルフィン、ノルブプレノルフィン、これらのグルクロニドの迅速な測定が可能になりました。RRLC カラムを用いることにより、各グループセグメント内のピークを分離することが可能になりました (図 2)。ソフトウェアにより、プリカーサイオンからの二次的なトランジションをモニタリングし、定量イオンに対する割合を自動的に計算することが可能です。割合が検量線の 20% 以内でなければ、同定は不合格と判定されます。これは、トリプル四重極質量分析計

の追加機能で、法廷がラボデータに異議を申し立てることがよくある法医学分析において極めて重要です。二次的なトランジションをモニタリングすることで結果にさらなる信頼性を与え、主要プロダクトイオン (定量イオン) と比較した二次的なトランジション (クオリファイアイオン) に対する割合を適用することによって、血中薬物の同定をさらに強化します。ソフトウェアがクロマトグラムウィンドウに割合をプロットするため、オペレーターはソフトウェアにより表示される「不確実性」の範囲を用いて、ポジティブかどうかを視覚的に評価することが可能です (図 3)。

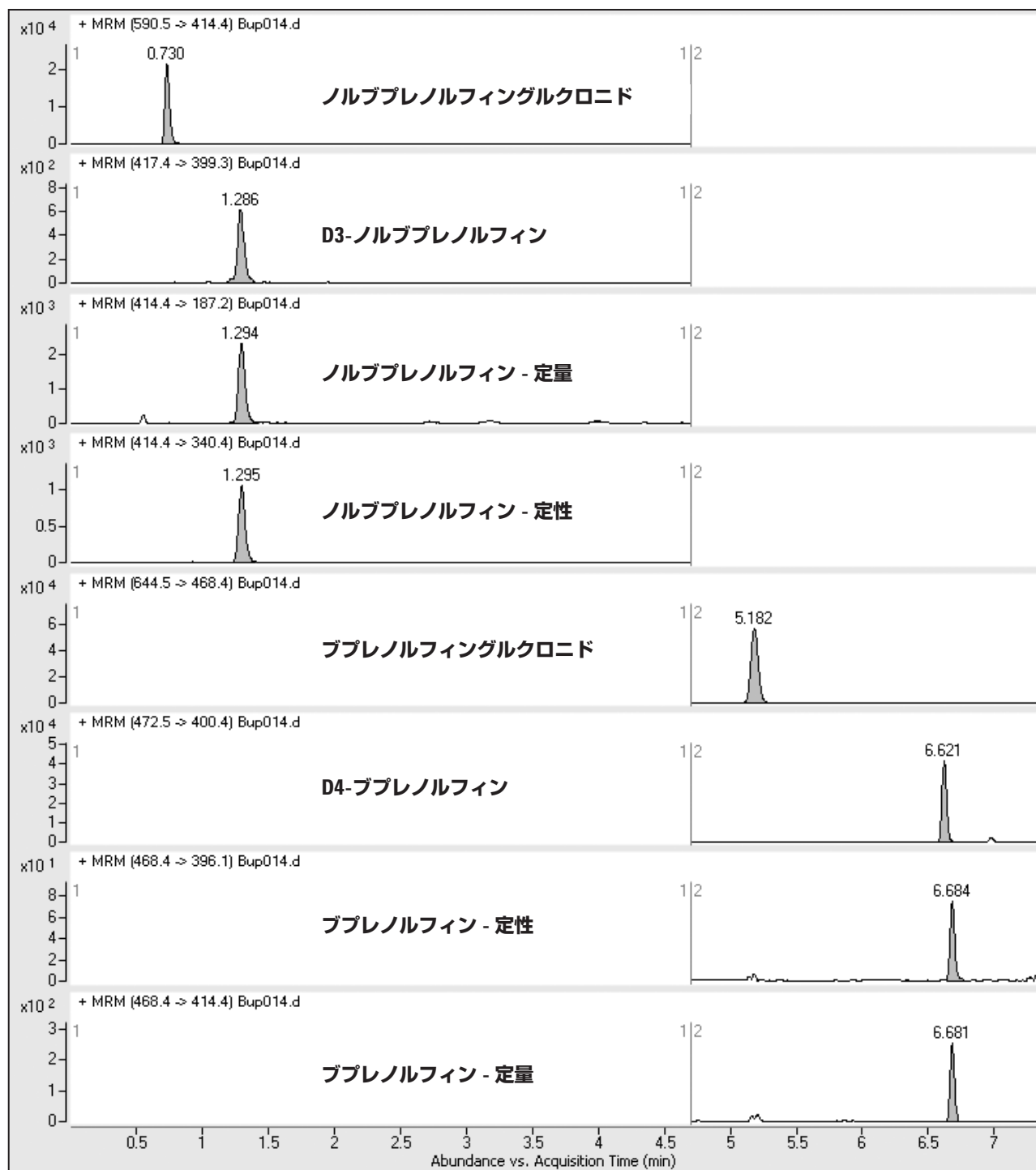


図 2. 信頼できる尿検体から抽出されたブプレノルフィン、ノルブプレノルフィン、ブプレノルフィングルクロニド、ノルブプレノルフィングルクロニド

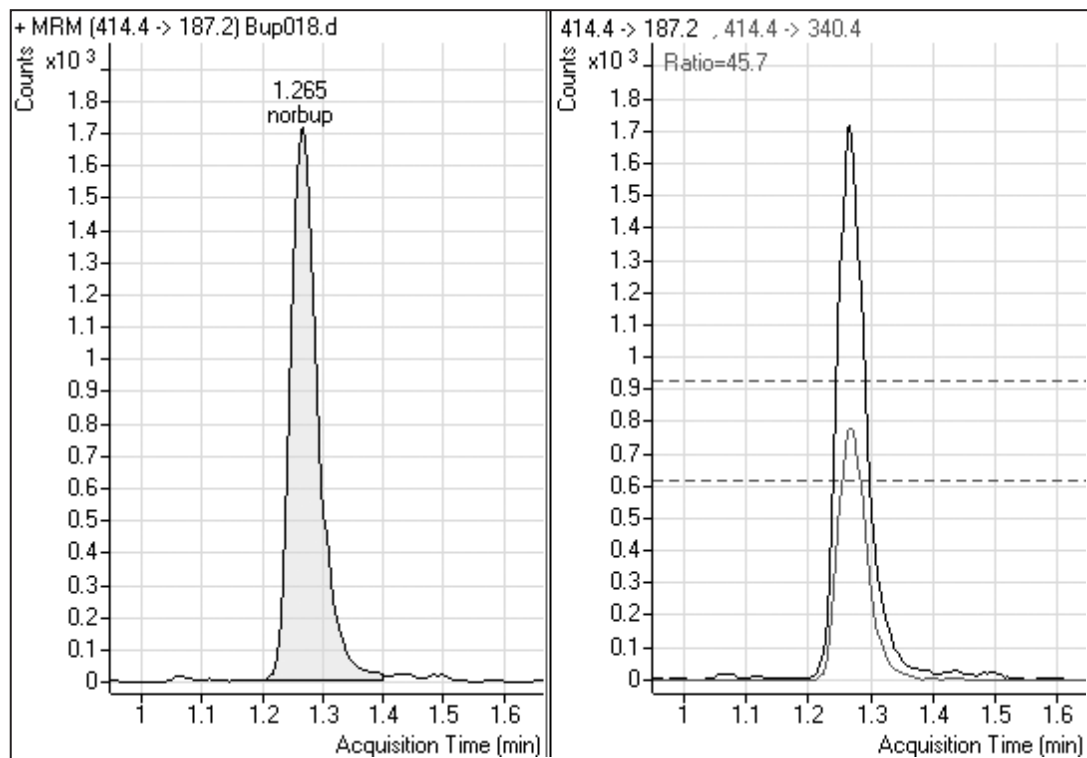


図 3. 尿中の遊離型ノルブプレノルフィン (98 ng/mL): 左には定量イオン、右にはクオリファイアイオンと定量イオンの重ね合わせ

結論

ここに示した分析法によって、加水分解や抽出を行うことなく、Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS/MS システムを用いて、尿中のブプレノルフィンとノルブプレノルフィン、グルクロニドの検出を行うことができます。本法は、尿中の低濃度ブプレノルフィンとノルブプレノルフィンの同定用の最初のメソッドで、指定の比率内で存在する必要があるクオリファイアイオンが含まれます。このメソッドは我々のラボで日常的に使用されています。

参考文献

1. L. Mercolini, R. Mandriolo, M. Conti, C. Leonardi, G. Gerra, M. A. Raggi, "Simultaneous Determination of Methadone, Buprenorphine and Norbuprenorphine in Biological Fluids for Therapeutic Drug Monitoring Purposes," *J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci* 847(2): 95–102 (2007)
2. A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin, "HPLC/MS Determination of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Biological Fluids and Hair Samples," *J Forens Sci* 42: 111–114 (1997)
3. E. I. Miller, H. J. Torrance, J. S. Oliver, "Validation of the Immunoassay Microplate ELISA for the Detection of Buprenorphine and its Metabolite Norbuprenorphine in Urine," *J Anal Toxicol* 30(2): 115–119 (2006)
4. E. J. Fox, V. A. Tetlow, K. L. Allen, "Quantitative Analysis of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Urine Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry," *J Anal Toxicol* 30(4): 238–244 (2006)
5. R. Kronstrand, T. G. Selden, M. Josefsson, "Analysis of Buprenorphine, Norbuprenorphine and Their Glucuronides in Urine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry," *J Anal Toxicol* 27: 465–470 (2003)

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

このアプリケーションノートに関する詳細は、Agilent Technologies Inc. の Michael Zumwalt にお問い合わせください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
June 13, 2007
5989-7072JAJP



Agilent Technologies